

COMPARAREA METODELOR DE TESTARE A REZIDUURILOR DE FTALAȚI ÎN VINURI

AUTOR: DUMITRU LOZACOVICI

Conducător științific: dr. hab. prof. univ. acad. Gheorghe DUCA,
dr. hab. prof. univ. Rodica STURZA

Academia de Științe a Moldovei

Abstract: Problema expunerii populației contaminării cu ftalați reprezintă o preocupare majoră a unor organisme internaționale de reglementare, dar și a organizațiilor non guvernamentale, a ecologiștilor, etc. Respingerea de către ROSPOTREBNADZOR a unor loturi de vin moldovenesc sub pretextul că ar conține dibutilftalat a cauzat nu doar prejudicii materiale producătorilor moldoveni, dar și enorme prejudicii morale, cu impact direct asupra reputației ramurei vitivinicole moldovenești. În articol se examinează metodele de testare a reziduurilor de ftalați în vinuri, reglementarea problemei la nivel național și internațional, căile posibile de contaminare a produselor alimentare.

Cuvinte cheie: reziduuri de ftalați, cromatografie gazoasă, mass-spectroscopie, vinuri, dibutilftalat.

Introducere

Ftalații reprezintă o clasă de produse chimice, constituite dint-un inel benzenic și două grupări carboxilice în poziția *orto*- (figura 1), care se utilizează extrem de larg, fiind în special folosiți drept plastifcatori – adaosuri la substanțele polimerice (mase plastice, cauciucuri, vopsele) (90% din producția mondială de ftalați, care constituie în mediu 3 mln tone/an). Se folosesc pentru calitatea de a imprima polimerilor (PVC) plasticitate, extensibilitate și rezistență la rupere. Alte 10% din producția mondială de ftalați se folosesc drept solvenți, denaturanți pentru alcool, în produsele cosmetice, de parfumerie, pesticide, etc. Ftalații nu sunt legați chimic în matricea polimerului, prin urmare, pot să migreze în lichidul ce vine în contact cu acesta, sau chiar să treacă în aer. Solubilitatea ftalaților în apă este foarte redusă, spre exemplu – pentru dibutilftalat (DBP) solubilitatea în apă constituie doar 0,1%. Migrarea lor este accelerată în prezența grăsimilor și a alcoolului, deoarece aceștia contribuie la o solubilizare mai importantă a ftalaților.

Expunerea la ftalați nu este întotdeauna problematică, deoarece unii dintre aceștia nu sunt recunoscuți drept toxici (di-isodécyle DIDP, di-isononyle DINP) și se utilizează pe larg în diverse dispozitive medicale (figura 1).

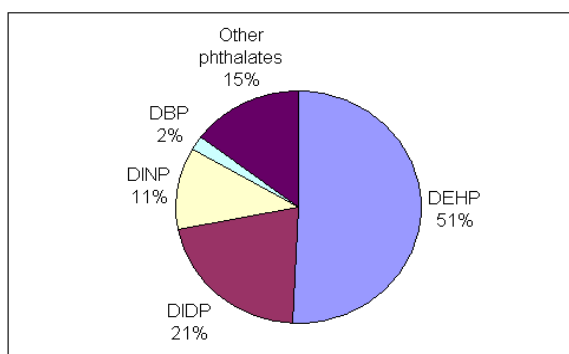
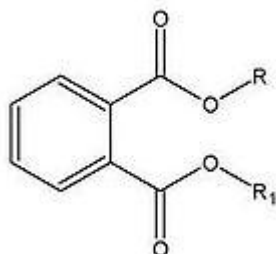


Figura 1. Utilizarea ftalaților ca plastifcatori

Mulți cercetători atestă, că rata de expunere la contaminare cu ftalați în majoritatea cazurilor este sub limita dozei zilnice tolerabile (DZT) [1-6]. Dar deoarece ftalații sunt omniprezenți, este destul de dificil

de a determina cu exactitate doza expunerii. Conform unui studiu internațional [5], acest indice se situează în următoarele limite (tabelul 1). Femeile și copiii mici sunt cei mai expuși.

Tab. 1. Dosa zilnică de expunere la ftalați pentru diferite categorii de populație¹

Categorია/ vârsta	Categorii de vârstă				
	Copii 0-1	Copii 1- 3	Copii 4- 10	Femei 18- 20	Barbati 18- 80
Doza zilnică, $\mu\text{g} / \text{kg GC}$	55- 380	20- 183	5- 54	8- 124	8- 92

¹GC – greutate corporală,

Diferite țări au adoptat, pentru o categorie de ftalați, dispoziții legale și recomandări referitor la nivelul maxim tolerabil de expunere la acțiunea lor (tabelul 2).

Tabelul 2 . Reglementarea expunerii la acțiunea unor ftalați și clasificarea lor

Compuși	Valori limită de expunere ¹	Clasificare ²
DMP-dimetil ftalat	5 mg.m ⁻³ (USA, Franța)	
DEP- dietil ftalat	5 mg.m ⁻³ (USA, Franța)	
DBP- dibutil ftalat	5 mg.m ⁻³ (USA, Franța) 5 mg.m ⁻³ (Irlanda, Anglia) 3 mg.m ⁻³ (Suedia, Danemarca)	N ; R50 T ; Repr. Cat.2 ; R61 Repr. Cat.3 ; R62 28e ATP (2001)
BBP- benzilbutil ftalat	5 mg.m ⁻³ (Suedia, Danemarca) 5 mg.m ⁻³ (USA, Franța)	N ; R50-53 T ; Repr. Cat.2 ; R61 Repr. Cat.3 ; R62 29e ATP (2004)
DEHP-etilhexil ftalat	5 mg.m ⁻³ (USA, Franța) 10 mg.m ⁻³ (Germania) 10 mg.m ⁻³ (STEL3 USA)	5 mg.m ⁻³ (USA, Franța) ; 10 mg.m ⁻³ (Germania) 10 mg.m ⁻³ (STEL3 USA)

1 VME : TLV-TWA (Threshold Limit Value-Time Weight Average). Reprezintă valorile medii calculate pentru 8 h pe zi și 40 h pe săptămână.

2 Clasificarea din anexa Directivei europene 67/548/CEE - N : toxic pentru mediul ambiant, R50-53 : foarte toxic pentru mediul acvatic. R50 : foarte toxic pentru organisme acvatice ; T : toxique. Repr. Cat.2 ; R60 : poate afecta fertilitatea ; Repr. Cat.2 ; R61 : riscuri în timpul sarcinii ; Repr. Cat.3 ; R62 : riscuri posibile pentru fertilitate ; Xn : nociv pentru specia umană ; R22 : nociv în cazul ingestiei.

3 STEL : Short-Term Exposure Limit ou valeurs limites d'exposition de courte durée. Reprezintă concentrațiile medii la care poate fi expusă persoana nu mai mult de 15 min pe zi.

Se consideră, că contaminarea prin inhalare și prin ingestie au un rol primordial. Cercetătorii olandezi atestă, că conținutul de DBP în apa de ploaie variază între 0,280-0,880 $\mu\text{g}/\text{l}$ [14]. În Suedia se estimează, că circa 75% din cele 200 t, utilizate anual, sunt eliminate în atmosferă (lacuri și vopsele, în special). Ulterior o bună parte poate fi inhalată, iar alta, după ploaie, nimereste în lanțul alimentar [8].

Ftalații sunt considerați substanțe nocive de gradul 3 (moderat toxici), care pot produce următoarele efecte (pe termen scurt) : alergii, astm, etc. Expunerea pe termen lung poate să aducă la perturbări ale sistemului nervos și endocrin [6-10]. Ftalații sunt considerați bioaccumulabili, fiind limitați prin biodegradare, deaceia pot să se acumuleze în sol, apă și în plante, sporind riscul contaminării prin lanțul alimentar [11-12].

Autoritatea europeană de securitate a alimentelor (EFSA) a fixat doza zilnică tolerabilă (DZT) pentru următorii esteri ai acidului ftalic : 10 $\mu\text{g}/\text{kg GC}/\text{zi}$ pour le DBP (EFSA Journal 2005, 242), 500 $\mu\text{g}/\text{kg GC}/\text{zi}$ pour le BBP (EFSA Journal 2005, 241), 50 $\mu\text{g}/\text{kg GC}/\text{zi}$ pour le DEHP (EFSA Journal 2005, 243). Pentru alți ftalați, precum DEP, DMP și DOP nu a putut fi stabilită de către EFSA. BBP și DBP nu sunt autorizați pentru compoziția vopselelor și a lacurilor aplicate peliculelor de celuloză regenerată, care poate veni în contact cu alimentele (Directiva 2004/14/CE din 29 ianuarie 2004). Utilizarea DBP, BBP și DEHP în materiale din plastic și alți polimeri destinați contactului cu produsele alimentare este reglementată conform directivei europene 2007/19/CE din 02 aprilie 2007.

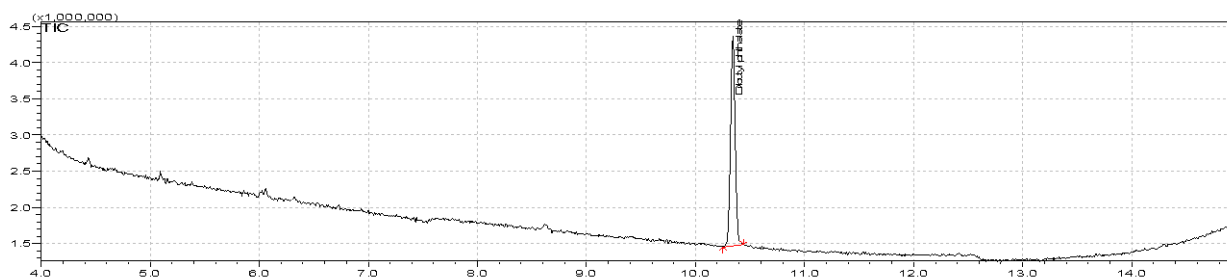
Conținutul de DBP este reglementat în Federația Rusă prin documentul normativ ГИ 2.3.3.972-00, limita de admisibilitate fiind stabilită la nivelul limitei de detectare a metodei : < 0,01 mg/kg. În UE pentru

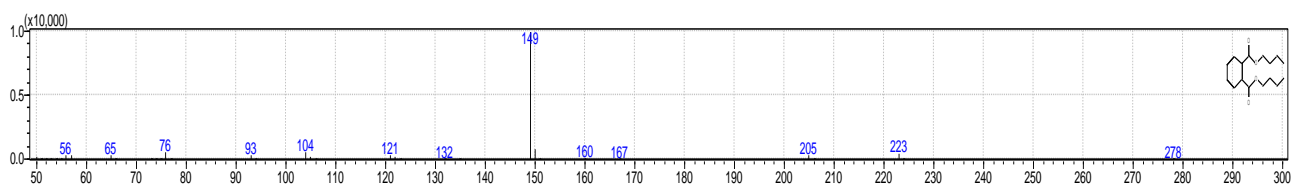
esterul dibutil ftalat este stabilită o limită de migrare specifică $LMS = 0,3 \text{ mg DBP/kg de simulant de aliment}$ (Directiva 2007/19/CE). Limita de migrare specifică (LMS) se exprimă întotdeauna ca o concentrație în alimente sau simulanți. În cazul vinului drept simulant de alimente servește soluția de 15% etanol.

Ținând seama de dificultățile tipului de analiză afectat de o toleranță analitică mare, precum și de nivelul maxim admisibil de 0,01 mg/kg, în laboratorul Centrului Național de Verificare a Calității Producției Alcoolice au fost optimizate condițiile de testare a reziduurilor de ftalați în produse vinicole. Inițial au fost analizate metodele cunoscute:

Metoda GC/MS, EI, Scan (Franța)	Metoda HS-SPME-GC-MS, CW-DVB (Germania, Spania)
<p><i>Extracție</i> : 50 ml produs + 100 ml hexan (grad de puritate – HPLC), se agită timp de 2 ore, apoi se lasă în contact timp de o noapte. Se decantează lichidul. Se recuperează faza apoasă pentru o nouă extracție cu 50 ml de hexan (în condiții similare – două ore agitare continuă). După decantare, se unesc fracțiile hexanice, se usucă cu sulfat de sodiu anhidru, apoi se plasează într-un tub Turbovap. Se concentrează prin evaporarea hexanului până la 500 μl (0,5 ml). Apoi se aduce volumul la 2 ml cu hexan (grad de puritate – HPLC), cu ajutorul unui cilindru gradat.</p> <p>Se injectează 1 μl de extract brut în cromatograful echipat cu detector de masă și coloană DB-5MS: 30 m, 0,25 mm, 1 μm.</p> <p><u>Condiții cromatografice</u> Injector: 250$^{\circ}\text{C}$; Detector: 280$^{\circ}\text{C}$, Mod Scan; Coloana: $t^{\circ}=90^{\circ}\text{C}$, 1 min; Programarea temperaturii: 8$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 250$^{\circ}\text{C}$, apoi 4$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 280$^{\circ}\text{C}$; apoi 5$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 300$^{\circ}\text{C}$</p>	<p><u>Extracția HS-SPME</u>: 4 ml produs (similar – soluția standard cu un conținut de 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de dibutilftalat) se transferă într-o vială de 10 ml, în care s-au introdus în prealabil 1,2 g de NaCl (puritate CDA). Proba se incubează timp de 1 min (60$^{\circ}\text{C}$) pentru a promova volatilitatea compușilor (Head-Space). Ulterior temperatura se majorează cu pasul de 10$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 150$^{\circ}\text{C}$, se menține 1 min, apoi se majorează câte 5$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 180$^{\circ}\text{C}$; se menține 2 min, apoi se majorează temperatura cu 20$^{\circ}\text{C}/\text{min}$ până la 240$^{\circ}\text{C}$ și se menține 6 minute.</p> <p><u>Condiții cromatografice</u>: Se utilizează fibra CW-DVB cu 0,8 mm I.D., cu temperatura optimă de desorbție de 250$^{\circ}\text{C}$. Eluentul – He (grad de puritate – 99,996%), debitul – 1,0 ml/min. Ionizarea – impact de electroni (EI), x 1850V. Regime termice: 200$^{\circ}\text{C}$ trapă, 60$^{\circ}\text{C}$ curbură, 280$^{\circ}\text{C}$ –linii de transfer. Regimul de lucru: În mod Ion storage (SIS), după raportul m/z cel mai abundent (149).</p>

A fost stabilit regimul optimal de extracție a reziduurilor de ftalați în solvenți extra-puri (CHCl_3), conform schemei: 100 ml vin + 20 ml CHCl_3 (grad de puritate – HPLC), se plasează în agitator, se agită timp de 2 ore, apoi se lasă în contact timp de 2 ore. Se decantează lichidul. Din fracția organică se preia și se injectează 1 μl în cromatograful echipat cu detector de masă și coloană DB-5MS: 30 m, 0,25 mm, 1 μm . Ulterior s-au stabilit condițiile optime (cromatogramă, GCMS-QP2010 x AOC-5000). Injector: 260 $^{\circ}\text{C}$; Detector: 280 $^{\circ}\text{C}$, Mod SIM; Coloana: $t^{\circ}=150^{\circ}\text{C}$, 1 min; $V=1 \mu\text{L}$. În figura 2 este prezentată cromatograma și spectrul de masă a standardului ($\text{C}(\text{DBP})= 1,03 \text{ mg}/\text{dm}^3$).

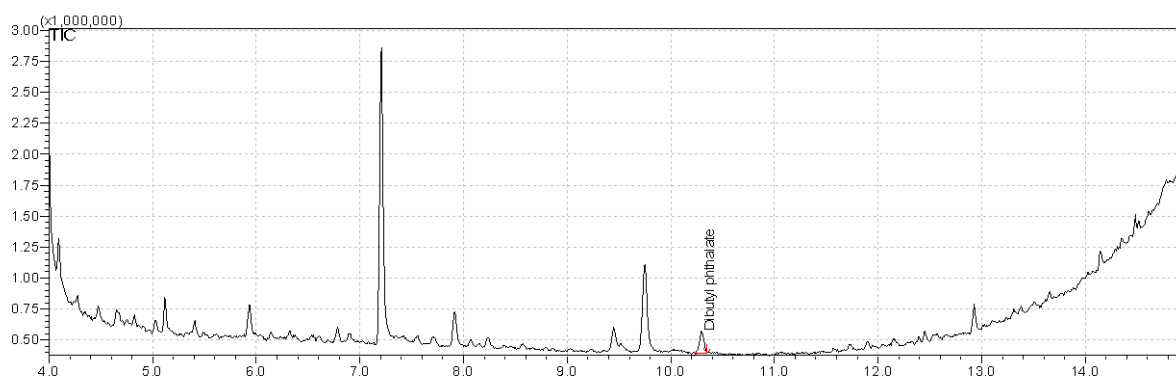




Peak#	Name	R. Time	Peak Report TIC		Height
			Area	Area%	
1	Dibutyl phthalate	10.342	8665634	100.00	2894836
			8665634	100.00	2894836

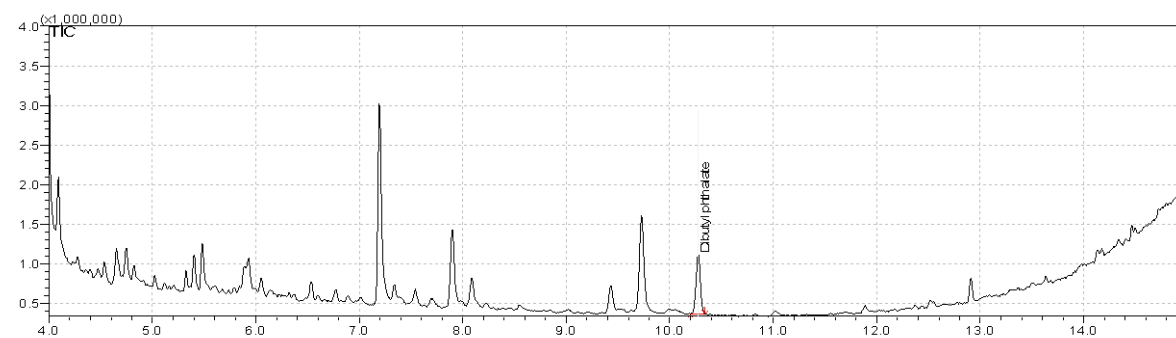
Figura 1. Cromatograma soluției standard C(DBP)= 1,03 mg/dm³

În figura 3a și 3b sunt prezentate cromatogramele unui vin alb (Chardonnay) și roșu (Cahor):



Peak#	Name	R. Time	Peak Report TIC		Height
			Area	Area%	
1	Dibutyl phthalate	10.295	535726	100.00	177688
			535726	100.00	177688

a)



Peak#	Name	R. Time	Peak Report TIC		Height
			Area	Area%	
1	Dibutyl phthalate	10.275	2245437	100.00	772747
			2245437	100.00	772747

b)

Figura 3. Cromatograme: a) –Chardonnay C(DBP)= 0,06 mg/dm³ ; b) - C(DBP)= 0,27 mg/dm³

Pentru a compara metoda elaborată în cadrul Centrului Național de Verificare a Calității Producției Alcoolice (GC/MS, EI, Scan/SIM) cu metoda HS-SPME-GC-MS, CW-DVB, au fost efectuate o serie de analize comparative în laboratorul Shimadzu-Europe (Germania, Duisburg). Pentru optimizarea condițiilor de extracție (SPME) au fost pregătite soluții simulant (vin sintetic: soluție de 12% etanol (v/v) + 6 g.L⁻¹ acid tartric), vin al, roze și roșu cu administrarea a 6 ftalați: DMP, DEP, DBP, DEHP, BBP, DOP. Concentrația totală a ftalaților: 0,025 mg.L⁻¹ (stimulant); 0,015

mg.L⁻¹(alb, roșu); 0,010 mg.L⁻¹ roze (standard intern – benzenul). Cromatogramele-tip sunt prezentate în figura 4.

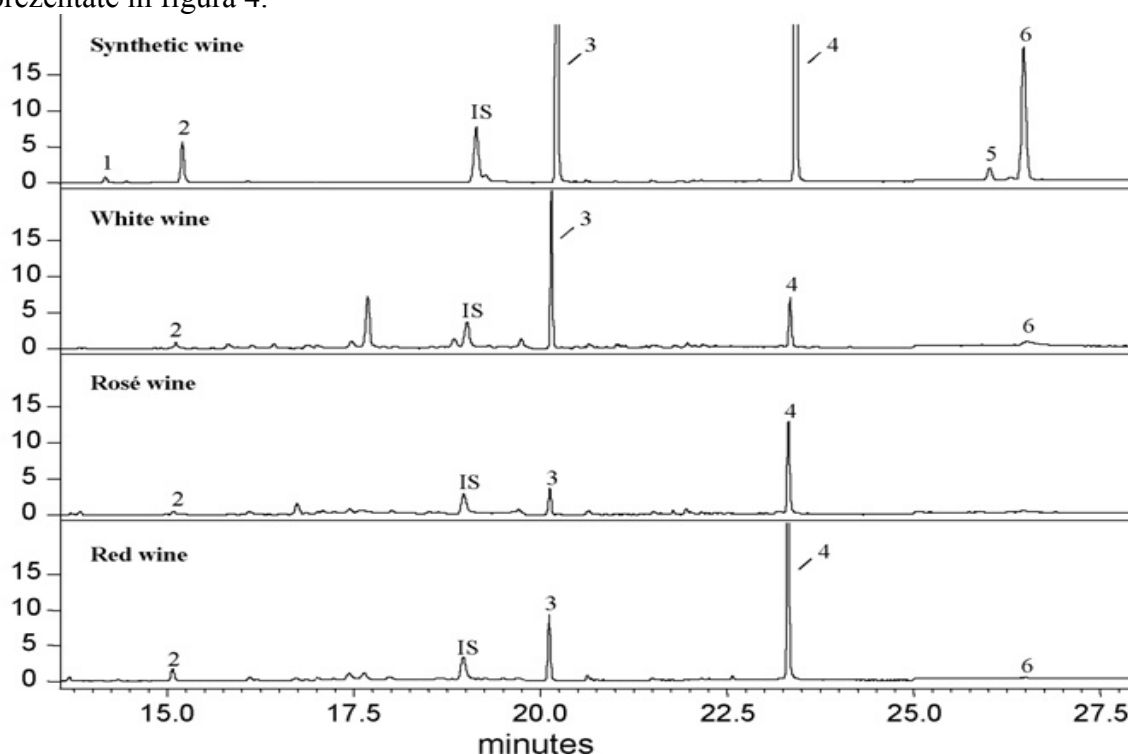


Figura 4. Cromatograme HS-SPME-GC-MS: soluție simulant (vin sintetic: soluție de 12% etanol (v/v) + 6 g/L acid tartric); vin alb de masă; vin roze și vin roșu.

Condiții cromatografice: PDMS-DVB , 70⁰ C, 60 min, 2,6 M NaCl. Identificarea picurilor : 1- DMP; 2- DEP; 3- DBP; 4 -DEHP; 5- BBP; 6- DOP (IS). Concentrația fialaților: 0,025 mg/L (stimulant); 0,015 mg/L (alb, roșu); 0,010 mg/L vin roze.

Ulterior au fost reproduse condițiile de testare a DBP prin metoda elaborată în cadrul Centrului Național de Verificare a Calității Producției Alcoolice (GC/MS, EI, Scan/SIM) cu metoda HS-SPME-GC-MS, CW-DVB. Rezultatele obținute prezintă un grad înalt de concordanță (tab. 3).

Tabelul 3. Compararea metodelor de testare a reziduurilor de DBP în vinuri

Nr. probei	Categorie produs	Metoda CNVCPA	Teste efectuate în laboratorul Shimadzu- Europe (Germania, Duisburg)		Media, mg/L	Eroarea medie, metoda CNVCPA/ / Metoda HS-SPME-GC-MS, CW-DVB %
			Metoda CNVCPA	Metoda HS-SPME-GC-MS, CW-DVB		
3070	Vin m/p brut c/c alb, a.2008	0,30±0,06	0,28±0,01	0,269±0,05	0,283	3,5/5
3071	Vin m/p brut c/c alb, a.2009	0,27±0,05	0,26±0,01	0,244±0,05	0,258	3,0/5
3029	Vin m/p tratat c/c roșu, 2009	0,18±0,01	0,19±0,06	0,163±0,06	0,178	3,5/6
2971	Vin sec roșu „Cabernet”, 2008	0,23±0,03	0,25±0,06	0,227±0,04	0,236	4,5/4

Analiza rezultatelor obținute demonstrează aplicabilitatea ambelor metode. Totuși, în domeniul concentrațiilor mici (<0,05 mg/L) sensibilitatea metodei HS-SPME-GC-MS este mai înaltă, în timp ce la concentrații medii și mari metoda HS-SPME-GC-MS prezintă o repetabilitate redusă.

Bibliografie

1. CE : The Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices : Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticized PVC
2. EU RA DBP 2004
3. Communication 2006/C 90/04 du 13 avril 2006 de la commission européenne
4. CE JRC Institute of health and Consumer protection Toxicology and chemical substance. Phthalates Risk assessment report – 2008.
5. CEHRH. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTPCERHR expert panel
6. CSTE. Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. Opinion on the results of a second risk assessment of phthalates in human health part. Brussels: European Commission; 2004.
7. T. Lovekamp-Swan, B.J. Davis, Environ. Health Perspect. 111 (2003) 139.
8. Caroline Sablayrolles, Mireille Montréjaud-Vignoles, David Benanou, Lucie Patria, Michel Treilhou . Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables. Journal of Chromatography A, 1072 (2005) 233–242.
9. Barnabé S, Beauchesne I, Cooper DG, Nicell JA. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. Water Res 2008, 42: 153-162.
10. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Heger W, Koch HM, Nagorka R, Roßkamp E, Schlüter C, Seifert B, Ullrich D. Phthalate in urine of children and in house dust. Int J Hyg Environ Health 2004, 207: 409 - 417.
11. Berman T, Hochner-Celnikier D, Calafat AM, Needham LL, Amitai Y, Wormser U, Richter E. Phthalate exposure among pregnant women in Jerusalem, Israel: results of a pilot study. Environ Int 2009, 35 : 353 - 357.
12. Montuori P, Jover E, Morgantini M, Bayona JM, Triassi M. Assessing human exposure to phthalic acid and phthalate esters from mineral water stored in polyethylene terephthalate and glass bottles. Food Addit Contam Part A 2007, 25: 511 - 518.
13. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Di(2-ethylhexyl) Phthalate Metabolites May Alter Thyroid Hormone Levels in Men. Environ Health Perspect 2007, 115: 1029 - 1034.
14. Peakall DB. Phthalate esters: occurrence and biological effects. Residue Rev 1975, 54: 1 - 41.
15. Peijnenburg WJGM, Struijs J. Occurrence of phthalate esters in the environment of the Netherlands. Ecotoxicol Environ Safe 2006, 63: 204 - 215.